

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-134100

(43)Date of publication of application : 28.05.1996

(51)Int.Cl.

C07K 16/28  
C07K 16/18  
C12P 21/08  
G01N 33/53  
// A61K 39/395  
C12N 15/02  
(C12P 21/08  
C12R 1:91 )

(21)Application number : 06-274753

(71)Applicant : UNITIKA LTD

(22)Date of filing : 09.11.1994

(72)Inventor : WATANABE MITSUO

## (54) PRODUCTION OF SACCHARIDE CHAIN-SPECIFIC ANTIBODY RECEPTOR

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a saccharide chain-specific antibody which can simply detect a glycoprotein having a cancer-specific glycoside chain and is useful in the diagnosis and treatment of cancers by immunizing an animal which becomes immunologically tolerant to a soluble glycoprotein having no saccharide chain bonded with a soluble glycoprotein bound with a saccharide chain.

**CONSTITUTION:** In a gene coding a soluble glycoprotein such as  $\alpha$ -fetoprotein, a codon responding to amino acid (Asp) to which the saccharide chain bonds is exchanged with a codon responding to another amino acid by the mutation transduction technique to prepare a recombinant plasmid. Then, the plasmid is expressed in a COS7 cell originated from monkey kidney to prepare a soluble protein having no saccharide chain bonded. This protein is dosed to a newborn of an animal such as mouse to obtain an animal immunologically tolerant to the soluble glycoprotein having no saccharide chain bonded. Then, this animal is immunized with a soluble protein bound with a saccharide chain to obtain this saccharide chain-specific antibody which acts on the saccharide chain moiety of the soluble glycoprotein, thus can simply determine the soluble glycoprotein having a saccharide chain structure specific to some diseases, for example, cancer or the like.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

## \* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

### [Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the manufacture approach of the sugar chain specific antibody which acts on the sugar chain part of fusibility glycoprotein specifically.

[0002]

[Description of the Prior Art] It is known for fusibility glycoprotein, such as alpha fetoprotein (AFP), and a carcinoembryonic antigen (CEA), chorionic gonadotropin, gamma glutamine transferase protein, by canceration of a cell that the structure of a sugar chain will change.

[0003] For example, in liver disease, such as liver cancer, alpha fetoprotein is a kind of the fusibility glycoprotein with which being emitted into blood is known, and serves as an important parameter in the diagnosis of liver cancer. It is reported that the molecular species from which sugar chain structure differs exists in alpha fetoprotein in recent years, and a useful thing came to be known for the distinction with good nature diseases, such as icterus, the hepatoma, etc. of the fractionation quantum based on the difference in sugar chain structure. For this object, fix an anti-alpha fetoprotein antibody in one solid phase, and alpha fetoprotein is caught until now. By among these, the approach of detecting only the alpha fetoprotein combined with specific lectin by the lectin which carried out enzyme labeling and the agarose gel electrophoresis containing 2 lectin Alpha fetoprotein is separated based on the difference of the compatibility over a sugar chain. After imprinting to a nitrocellulose membrane etc., the approach [the cancer letter (Cancer Lett.) 1986; 31:325-331] of detecting by the immunity staining technique using an anti-alpha fetoprotein antibody has been developed. However, the approach of 1 had the low compatibility over the sugar chain of lectin, and detection sensitivity was not a \*\*\*\*\* thing practically at the field of a clinical laboratory test. Moreover, the approach of 2 could separate alpha fetoprotein based on the difference in a sugar chain efficiently, although it had the engine performance which can be equal to a clinical laboratory test enough at an activity, it was complicated, required long duration, and had the problem that the special equipment for measuring the coloring reinforcement after immunity dyeing further was required. [ of separating protein ]

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Then, the approach was carried out and development of the diagnostic drug using the antibody which recognizes specifically the fusibility glycoprotein containing the sugar chain which solves such a problem, and which appears for diseases, such as cancer, specifically, and a remedy was desired.

[0005] as the approach of producing a specific antibody to a neoplasm — JP,60-190721,A — an animal — a Homo sapiens normal cell, normal tissues, or those membrane components — prescribing a medicine for the patient — immunological tolerance (immunity-unresponsive condition) — guiding — after an appropriate time — a human tumor cell, neoplasm tissues, or those membrane components — immunity — carrying out — a neoplasm — the approach of producing a specific monoclonal antibody is indicated. However, although it was possible to have produced the antibody to an antigen which the amount of manifestations increases in case according to this approach it existed in the film front face of neoplasm tissue or a tumor cell and a normal cell cancerated, it was difficult to obtain the antibody which acts on the fusibility glycoprotein containing a sugar chain from which it is secreted [ sugar chain ] from a cell and structure changes with tumorigenic transformation specifically.

[0006] This invention aims at offering the manufacture approach of the sugar chain specific antibody which acts on the sugar chain part of the fusibility glycoprotein which has specific sugar chain structure for diseases, such

as cancer, specifically.

[0007]

[Means for Solving the Problem] In order to solve such a technical problem, when this invention person did wholeheartedly immunity of the animal which became immunological tolerance with the fusibility glycoprotein which the sugar chain combined to the fusibility glycoprotein which has not combined a sugar chain as a result of examination, he reached [ that the antibody which recognizes the sugar chain part of fusibility glycoprotein specifically is obtained, and ] a header and this invention.

[0008] That is, this invention makes a summary the manufacture approach of the sugar chain specific antibody characterized by manufacturing the sugar chain specific antibody which carries out immunity to the fusibility glycoprotein which has not combined a sugar chain, and acts on it specifically at the sugar chain part of fusibility glycoprotein with the fusibility glycoprotein with which the sugar chain combined the animal which became immunological tolerance.

[0009] Hereafter, this invention is explained to a detail. As fusibility glycoprotein used for this invention, alpha fetoprotein, a carcinoembryonic antigen (CEA), the chorionic gonadotropin, gamma glutamyl transferase protein, etc. are mentioned, for example.

[0010] In this invention, the fusibility glycoprotein which has not combined probably the sugar chain from which the sugar chain of these fusibility glycoprotein was removed performs immunological tolerance. It can obtain by processing the fusibility glycoprotein refined as fusibility glycoprotein which has not combined these sugar chains from the cell which produces these fusibility glycoprotein among a Homo sapiens blood serum, for example by the Glico peptidase F (TAKARA SHUZO CO., LTD. make) etc., and removing a sugar chain part. Moreover, as for the fusibility glycoprotein which has not combined these sugar chains, it is possible to also make it produce with Escherichia coli using gene modification technology. In this case, in order to obtain the fusibility glycoprotein which has not combined the sugar chain which maintained the disulfide bond of intramolecular and had the structure near the quality of a natural product, it is desirable to use eukaryotic cells, such as a COS cell, and a CHO cell, an L cell. In order to make the fusibility glycoprotein which has not combined a sugar chain with these cells produce The approach of cultivating a cell by sugar chain composition inhibitor's like tunicamycin existence-ization, the amino acid residue which a sugar chain combines -- for example Asparagine residue [Asn232 of alpha fetoprotein, proceeding OBU THE National academy OBU Science U.S.A. (Proc., Natl., Acad., Sci., and USA.), 80 : 4604-4608 and 1983] are permuted by other amino acid by technique, such as the enzyme-DNA amplifying method (Polymerase chain reaction: PCR), and the approach of making it discover in the above cells is mentioned.

[0011] Thus, immunological tolerance can be guided for the cell which produces the fusibility glycoprotein which has not combined the fusibility glycoprotein which has not combined the obtained sugar chain, or a sugar chain to an animal newborn infants, such as a mouse, a rat, a rabbit, and a goat, and by pouring into the newborn infant within after-the-birth 24 hour preferably. Moreover, as mentioned above, amino acid substitution is introduced, and a sugar chain binding site can introduce the gene of carrier beam fusibility glycoprotein into the germ of an animal for variation by the conventional approach with marker genes, such as a neomycin resistance gene, and can guide immunological tolerance also by producing a transgenic animal. Furthermore, immunological tolerance can be guided also by administering orally the fusibility glycoprotein which has not combined a sugar chain. Thus, even if it carries out immunity of the animal which became immunological tolerance to the fusibility glycoprotein which has not combined a sugar chain with the fusibility glycoprotein which has not combined a sugar chain after that, there is no capacity which produces the antibody to it.

[0012] Next, what is necessary is just to carry out immunity of the animal which became immunological tolerance to the fusibility glycoprotein which has not combined a sugar chain in this way with the fusibility glycoprotein which the sugar chain combined. It is desirable to use L3 fraction of the alpha fetoprotein by which can refine as these fusibility glycoprotein from the culture medium of the cell which produces the inside of the blood serum of a chorion cancer patient or a hepatocyte cancer patient or these fusibility glycoprotein, for example, for example, fractionation is carried out by TAKEITA's and others approach [a cancer letter (Cancer Lett.), 31:325-331, and 1986] when it is alpha fetoprotein.

[0013] The approach of immunity, such as an activity of the amount of the fusibility glycoprotein used which these sugar chains combined, an administration part, and an adjuvant, should just apply to the approach of obtaining the conventional antiserum. For example, in using a mouse, the first time often mixes with an adjuvant (for example, Freund's complete adjuvant) the fusibility glycoprotein which the 0.01-1mg sugar chain combined preferably, and it medicates hypodermically or intraperitoneal with 0.001-10mg per time per mouse. Furthermore,

what is necessary is to medicate hypodermically or intraperitoneal only with the fusibility glycoprotein which the sugar chain combined in a vein after two-week or more progress.

[0014] Thus, after carrying out the last immunity, a blood serum is extracted from an animal after one – four weeks. The antibody which acts on the sugar chain part of fusibility glycoprotein specifically can be obtained by making it stick to the column filled up with the fusibility glycoprotein (for example, sepharose etc.) with which for example, the protein A column and the sugar chain preferably used for immunity combined this blood serum, for example, the simple substances which fixed L3 fraction of alpha fetoprotein, and being eluted. Moreover, after carrying out immunity in the animal which became immunological tolerance as mentioned above, and the fusibility protein in which the sugar chain combined the mouse or the rat preferably and checking production of an antibody, it is also possible to obtain the hybridoma which prepares a spleen cell or an iliac-lymph-node cell from this animal, and produces a monoclonal antibody by the well-known approach.

[0015] Thus, when the alpha fetoprotein which has sugar chain structure peculiar to a cancer patient as fusibility glycoprotein is used in order that the obtained antibody may act on the sugar chain part of fusibility glycoprotein specifically for example, it can detect selectively the alpha fetoprotein seen by benign liver disease patient like icterus, and the alpha fetoprotein specifically looked at by cancer patients, such as liver cancer, using this antibody.

[0016]

[Example] Next, an example explains this invention concretely.

[0017] The example 1 (creation of the alpha fetoprotein which has not combined a sugar chain) of reference [proceeding OBU THE s, such as, MORINAGA National Academy OBUSAIENSU It is based on the base sequence of Homo sapiens origin alpha fetoprotein given in 80, 4606–4608, and 1983]. the U.S.A. (Proc.Natl.Acad.Sci.USA) — 5' and 3' — the primer of a field is compounded — a Hepatoma cDNA library (the Toyobo Co., Ltd. make —) The gene fragment which carries out the code of the alpha fetoprotein using the PCR method from code No.CLHL1015b was amplified, and separation purification of the DNA fragment of the target size was carried out by agarose gel electrophoresis. It is EcoRI to both ends after graduating an end for the obtained DNA fragment using a branching kit (TAKARA SHUZO CO., LTD. make). The linker (TAKARA SHUZO CO., LTD. make) was combined using the ligation kit (TAKARA SHUZO CO., LTD. make). After disassembling the DNA fragment of the obtained alpha fetoprotein by EcoRI (TAKARA SHUZO CO., LTD. make) overnight, separation purification was carried out by agarose gel electrophoresis. It is HindIII of pCDM 8 vector (the Funakoshi Co., Ltd. make, IV–3082–01) about this fragment. Use a ligation kit (TAKARA SHUZO CO., LTD. make) for a part, and it is made to combine with it, and is E.coli HB101. The transformation of the stock (TAKARA SHUZO CO., LTD. make) was carried out. The alpha fetoprotein gene chose the plasmid inserted in the forward direction from the obtained colony, and it was named pCDM 8–AFP.

[0018] Next, the plasmid which replaced with AGT the codon AAT equivalent to the amino acid residue Asp232 of the alpha fetoprotein by which a code is carried out to pCDM 8–AFP was produced by the mutation introducing method using the PCR method, and it was named pCDM 8–AFP (NS). The DEAE dextran method was used for COS7 cell (ATCC CRL 1651) of the ape kidney origin, and obtained pCDM 8–AFP (NS) was introduced into it. It is CO2 about the cell after installation. It cultivated within the incubator and alpha fetoprotein was made to produce in a culture medium. When this culture supernatant was analyzed by electrophoresis, the alpha fetoprotein which has not combined a sugar chain was produced from the cultivated cell. These culture supernatants are collected and it is an anti-alpha fetoprotein antibody. When refined using the anti-alpha fetoprotein antibody column which fixed] made from NO.5107[Medex, Inc biotechnology KEMIKA (Medix Biochemica) using an antibody / antigen fixed kit No.44895 (pierced earring company make), the alpha fetoprotein (1) which has not combined an almost [ in electrophoresis ] single sugar chain was obtained. The alpha fetoproteins (1) which have not combined the sugar chain of about 1250microg were collected from the culture supernatant for 50 petri dishes of the diameter of 10cm.

[0019] The example 2 (creation of the alpha fetoprotein which the sugar chain combined) of reference HepG2 of the Homo sapiens hepatic-carcinoma origin a cell (ATCC HB 8065) — cultivating — a [culture-medium:minimum essential culture medium (Minimum Essential medium) — storing up the alpha fetoprotein which 41500–034.] by the life tech oriental company, and a sugar chain combined into culture medium, and refining this like the example 1 of reference using a column chromatography — SDS The alpha fetoprotein which the almost [ in electrophoresis ] uniform sugar chain combined was obtained. About 1400microg recovery per culture supernatant for ten plates of the diameter of 10cm of was done. This was further separated by TAKETA's and others approach [the cancer letter (Cancer Lett.) 1986 and 31,325–331], i.e., the agarose gel electrophoresis

containing lectin, and alpha fetoprotein (2) 300microg which the sugar chain combined was collected from the fraction equivalent to L3.

[0020] It is COS7 cell which produces the alpha fetoprotein which has not combined the sugar chain produced in the example 1 of example 1 reference to the abdominal cavity of three newborn infants (less than [ after-the-birth 24 hour ]) of a rabbit 1x10<sup>5</sup> A medicine was prescribed for the patient so that it might become a cell/\*\*. The blood serum was extracted from the lug of this rabbit one month after, and the antibody titer to the alpha fetoprotein (1) which has not combined the sugar chain of this blood serum was measured by enzyme immunoassay (ELISA). Namely, the alpha fetoprotein (1) which has not combined the sugar chain created in the example 1 of reference is made to stick to 96 hole microtiter plate physically. What diluted with phosphate buffered sarin (PBS) the blood serum extracted by the above-mentioned approach to this 50 and 500 or 5000 times In addition, after leaving it at a room temperature (25 degrees C) for 2 hours, it washes by PBS, and it is the horseradish origin peroxidase-labeling goat anti-rabbit IgG further 100 every microliter per one well, respectively. The antibody (Bio-Rad make) was added and it was left for 2 hours. After washing this plate by PBS, when 3, 3', and the substrate liquid containing 5, 5', tetramethyl BENCHIJIN, and a hydrogen peroxide were added and the coloring reaction was performed, the antibody to the alpha fetoprotein (1) which has not combined a sugar chain was not contained in which blood serum.

[0021] Next, alpha fetoprotein (1) 50microg which has not combined the sugar chain created in the example 1 of reference was mixed with the Freund's complete adjuvant (NAKARAI tex company make) of the amount of isochore, the emulsion was produced, and immunity of this was administered hypodermically and carried out to the above-mentioned rabbit. After two more weeks, alpha fetoprotein (1) 100microg which has not combined the sugar chain created in the example 1 of reference was emulsion-ized with the Freund's complete adjuvant (NAKARAI tex company make) of the amount of isochore, and additional administration of this was carried out. The last immunity was performed by the alpha fetoprotein (1) independent which has not combined the sugar chain created in the example 1 of reference after three more weeks, after the two weeks, it collected blood from the lug and separation extraction of the blood serum was carried out. The antibody titer to the alpha fetoprotein (1) which has not combined the sugar chain of this blood serum was measured like the above.

[0022] The result is shown in a table 1. In addition, antibody titer is ELISA obtained using the blood serum of the rabbit of three animals. It expressed with the average of the coloring reinforcement (OD405) which can be set.

[0023]

[A table 1]

血清の希釈率	抗 体 価
無 添 加	0. 1 1 8
1 / 5 0	0. 1 1 4
1 / 5 0 0	0. 1 2 1
1 / 5 0 0 0	0. 1 1 8

[0024] As shown in a table 1, the antibody to the alpha fetoprotein (1) which has combined the sugar chain from neither of the blood serums of the rabbits was not detected. It turns out that the immunological tolerance to the alpha fetoprotein (1) which has not combined a sugar chain was guided by prescribing for the patient from this the alpha fetoprotein (1) which has not combined a sugar chain with a newborn infant's inside.

[0025] Next, one month after, alpha fetoprotein (2) 50microg which the sugar chain produced in the example 2 of reference combined was mixed with the Freund's complete adjuvant (NAKARAI tex company make) of the amount of isochore to three newborn infants of a rabbit to whom it carried out in this way, and immunological tolerance was guided, the emulsion was produced to them, and immunity of this was administered hypodermically and carried out to them. After two more weeks, alpha fetoprotein (2) 100microg which the sugar chain produced in the example 2 of reference combined was emulsion-ized with the Freund's incomplete adjuvant (NAKARAI tex company make) of the amount of isochore, and additional administration was carried out. After three more weeks, the last immunity was performed by the alpha fetoprotein (2) independent which the sugar chain

produced in the example 2 of reference combined, it collected blood after the two weeks, and separation extraction of the 49ml of the blood serums was carried out.

[0026] Next, the antibody titer to the alpha fetoprotein (1) which has not combined the sugar chain of this blood serum was measured by the above-mentioned approach. Moreover, 96 hole microtiter plate which fixed the alpha fetoprotein (2) which the sugar chain combined was produced, and the antibody titer to the alpha fetoprotein (2) which the sugar chain combined similarly was measured. Furthermore, the alpha fetoprotein (2) which the sugar chain combined was processed by the Glico peptidase F (TAKARA SHUZO CO., LTD. make), the sugar chain part was removed, the alpha fetoprotein (3) which has not combined a sugar chain was produced, this was fixed to 96 hole microtiter plate, and the antibody titer to the alpha fetoprotein (3) which has not combined a sugar chain similarly was measured.

[0027] The result is shown in a table 2.

[0028]

[A table 2]

血清の希釈率	抗 体 価		
	対 (1)	対 (2)	対 (3)
1/50	0. 1 2 0	1. 2 4 0	0. 1 2 0
1/500	0. 1 1 4	1. 1 6 0	0. 1 2 4
1/5000	0. 1 2 2	0. 7 6 2	0. 1 2 8

(1) : 糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン (1)

(2) : 糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン (2)

(3) : (2) の糖鎖部分を除去した糖鎖の結合していない  
アルファフェトプロテイン (3)

[0029] As shown in a table 2, the antibody to the alpha fetoprotein (2) which the sugar chain combined was detected from all blood serums to the antibody to the alpha fetoprotein (3) which has not combined the alpha fetoprotein (1) which has not combined a sugar chain, and a sugar chain having been detected from neither of the blood serums. This shows that the obtained antibody recognizes the sugar chain part of the alpha fetoprotein (2) which the sugar chain combined.

[0030] It is COS7 cell which produces the alpha fetoprotein (1) which has not combined the sugar chain produced in the example 1 of example 2 reference to the abdominal cavity of the newborn infant (less than [ after-the-birth 24 hour ]) of a BALB/c mouse 1x10<sup>5</sup> A medicine was prescribed for the patient so that it might become a cell/\*\*. Alpha fetoprotein (2) which the sugar chain produced in the example 2 of reference combined was emulsion-ized after six weeks with the Freund's complete adjuvant (NAKARAI tex company make) of the amount of isochore, and this was administered hypodermically. Alpha fetoprotein (2) which the sugar chain produced in the example 2 of reference combined was emulsion-ized with Freund's incomplete adjuvant (NAKARAI tex company make) after two more weeks, and additional administration of this was carried out. The last immunity was performed after two more weeks by the alpha fetoprotein (2) independent which the sugar chain produced in the example 2 of reference combined, the three days after, it collected blood from the tail and the blood serum was obtained. When the antibody titer to the alpha fetoprotein (3) which has not combined the alpha fetoprotein (1) which has not combined the sugar chain of this blood serum, the alpha fetoprotein (2) which the sugar chain combined, and a sugar chain was measured like the example 1, only the antibody combined with the alpha fetoprotein (2) which the sugar chain combined was detected.

[0031] Then, the spleen of this mouse was extracted, it mixed at a rate of a myeloma cell 1 to myeloma cell NS-1 (ATCC TIB 18) which suspended that cell in RPMI1640 culture medium (product made from GIKOBU), and cultivated it beforehand, and the splenic cells 5 obtained from one mouse, and this was united using 50% of the weight of the polyethylene glycol 4000 (sigma company make). After suspending the cell after cell fusion in a HAT medium [what added HAT-Midia Supplement (Boehringer Mannheim make) to the GIT culture medium

(Japanese-made medicine company make)], it poured distributively on 96 hole microtiter plate, and cultivated for ten days at 37 degrees C. The hole which shows an antibody production positivity to the alpha fetoprotein which measured the antibody titer to the alpha fetoprotein (2) which the sugar chain of a culture supernatant combined like the example 1, and the sugar chain combined was chosen, and cloning was performed by repeating limiting dilution twice. Consequently, the hybridoma stock which produces the antibody which recognizes the alpha fetoprotein (2) which the sugar chain combined, and MAH 1-5 were obtained. The obtained hybridoma stock was cultivated by the 10ml GIT culture medium (Japanese-made medicine company make), and the culture supernatant was used as rough monoclonal antibody liquid. The antibody titer to the alpha fetoprotein (3) which has not combined the alpha fetoprotein (1) which has not combined the sugar chain of this rough monoclonal antibody liquid, the alpha fetoprotein (2) which the sugar chain combined, and a sugar chain was measured like the example 1. Moreover, the antibody titer to a carcinoembryonic antigen (screed PUSURA a bora tree company make, C0214) was similarly measured as contrast.

[0032] The result is shown in a table 3.

[0033]

[A table 3]

粗モノクローナル抗体液		抗 体 価			
ハイブリドマ株	抗体のクラス	対 (1)	対 (2)	対 (3)	対 CEA
MAH-1	I g G 1	0. 1 1 2	1. 1 5 0	0. 1 0 8	0. 1 1 6
MAH-2	I g G 1	0. 1 1 7	1. 0 2 8	0. 1 2 4	0. 1 1 8
MAH-3	I g G 1	0. 1 0 8	0. 7 8 4	0. 1 2 0	0. 1 1 8
MAH-4	I g G 1	0. 1 1 4	0. 8 9 8	0. 1 1 8	0. 1 1 0
MAH-5	I g G 1	0. 1 1 0	1. 0 7 8	0. 1 1 4	0. 1 1 2

(1) : 糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン (1)

(2) : 糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン (2)

(3) : (2) の糖鎖部分を除去した糖鎖の結合していない  
アルファフェトプロテイン (3)

CEA : 癌胎児性抗原

[0034] As shown in a table 3, each obtained monoclonal antibody reacted specifically to the alpha fetoprotein (2) which the sugar chain combined.

[0035] Example of reference 3 antibody / antigen fixed kit No.44895 (pierced earring company make) are used, and it is an anti-alpha fetoprotein antibody. The anti-alpha fetoprotein antibody column which fixed] made from No.5107[Medex, Inc biotechnology KEMIKA (Medix Biochemica) was produced. Next, after diluting with PBS 500ml of 494.2 ng/milliliter [ blood serums of the liver cancer patient who shows the alpha fetoprotein value of measurement] using an EI Gia-AFP kit (Green Cross Corp. make) 5 times, it dipped in the anti-alpha fetoprotein antibody column which equilibrated by PBS, non-adsorbing fractions were collected, and this was made into Sample A. Moreover, after diluting 500ml of the same liver cancer patient's blood serums with PBS 5 times, it dipped in the column [antibody and antigen fixed kit No.44895 which do not fix the anti-alpha fetoprotein antibody (pierced earring company make) at attachment], non-adsorbing fractions were collected like the above, and this was made into Sample B. The alpha fetoprotein value of Sample B was 83.1 ng(s)/a milliliter. Furthermore, the blood serum sample of the chronic-hepatitis patient who shows the alpha fetoprotein value of 92.3 ng/a milliliter was made into Sample C.

[0036] Next, the protein A column refined the antibody from the blood serum which carried out separation extraction in the example 1. That is, it dipped in the protein A sepharose column (pierced earring company make) which equilibrated with this buffer solution, after diluting 10ml of extracted blood serums with the sodium-carbonate buffer solution (pH9.6) of 50mM(s) 50 times. The tris hydrochloric-acid buffer solution (pH8.6) of 50mM washed after dipping, and it was eluted with the glycine hydrochloric-acid buffer solution (pH2.3). When the fractions containing an antibody were collected and having been dialyzed to PBS, the antibody solution (the

amount of total protein of 1.2mg) containing an anti-alpha fetoprotein antibody was obtained. The obtained antibody solution was diluted with the sodium-carbonate buffer solution (pH9.6) of 50mM(s), 100 microliter was poured distributively on each 96 hole microtiter plate, and it was left at 4 degrees C overnight. After removing this liquid, each hole was made full of 1 more% (W/V) of cow serum albumin (BSA), and PBS containing the sodium chloride of 0.15M, and it was left at the room temperature (25 degrees C) for 2 hours. Furthermore this liquid was removed, each hole was washed by the penetrant remover which consists of 0.2% (W/V) of Tween 20 (Tween20), 0.2% (W/V) of BSA, and the sodium phosphate buffer solution (pH7.2) of 20mM(s) containing the sodium chloride of 0.15M, and the anti-alpha fetoprotein solid phase-ized antibody plate was produced.

[0037] Thus, on the obtained anti-alpha fetoprotein fixed antibody plate, sequential dilution of the samples A, B, and C was carried out, and, in addition, it left 50 microliter at a time for 90 minutes at the room temperature (25 degrees C). after washing 3 times by the penetrant remover which showed this plate previously — anti- — what diluted alpha fetoprotein monoclonal antibody No.5108 (Medex, Inc make) with PBS 3000 times was added, and it was left at the room temperature (25 degrees C) for 30 minutes. Then, it washed 3 times by PBS, added at a time 50 microliter of things which diluted the goat anti-rabbit IgG antibody (Bio-Rad make) which carried out the indicator by the horseradish origin peroxidase further 300 times to each hole, and was left at the room temperature (25 degrees C) for 1 hour. Then, it washed 5 times by the penetrant remover, and chromophoric substrate liquid was left for 30 minutes at 100 microliter, in addition a room temperature (25 degrees C). 10% (W/V) of sodium-dodecyl-sulfate (SDS) 50 microliter was added, the reaction was suspended, and the absorbance of 415nm was measured. The result is shown in drawing 1 .

[0038] As drawing 1 is drawing showing the result when detecting alpha fetoprotein using the antibody manufactured by this invention, an absorbance (A460) is shown on an axis of ordinate, the dilution scale factor is shown on the axis of abscissa and it is shown in this drawing 1 As opposed to the antibody produced in the example 1 not reacting to a liver cancer patient's blood serum (sample A) processed by the anti-alpha fetoprotein antibody Since it has reacted, that this antibody is specific turns out to be a liver cancer patient's blood serum (sample B) which is not processed by the anti-alpha fetoprotein antibody to alpha fetoprotein. Furthermore, compared with the singularity over a chronic-hepatitis patient's blood serum (sample C), it turns out that the singularity over a liver cancer patient's blood serum (sample B) is dramatically high. If the reagent for measurement using the antibody obtained by this invention is used from this, the alpha fetoprotein which has the sugar chain structure accompanying liver cancer is specifically detectable.

[0039]

[Effect of the Invention] According to this invention, the sugar chain specific antibody which acts on the sugar chain part of fusibility glycoprotein specifically can be manufactured easily. Moreover, the fusibility glycoprotein which has sugar chain structure peculiar to diseases, such as cancer, can be measured simple by using the sugar chain specific antibody manufactured by this invention.

---

[Translation done.]



**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The manufacture approach of the sugar chain specific antibody characterized by manufacturing the sugar chain specific antibody which carries out immunity to the fusibility glycoprotein which has not combined a sugar chain, and acts on it specifically at the sugar chain part of fusibility glycoprotein with the fusibility glycoprotein with which the sugar chain combined the animal which became immunological tolerance.

---

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-134100

(43) 公開日 平成8年(1996)5月28日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	片内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 16/28		8318-4H		
16/18		8318-4H		
C 1 2 P 21/08		9358-4B		
G 0 1 N 33/53	V	9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	C
審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 7 頁) 最終頁に続く				
(21) 出願番号	特願平6-274753		(71) 出願人	000004503
(22) 出願日	平成6年(1994)11月9日			ユニチカ株式会社
				兵庫県尼崎市東本町1丁目50番地
			(72) 発明者	渡辺 光雄
				京都府宇治市宇治小椋23番地 ユニチカ株
				式会社中央研究所内

(54) 【発明の名称】 糖鎖特異的抗体の製造方法

(57) 【要約】

【構成】 糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質に免疫寛容になった動物を、糖鎖の結合した可溶性糖蛋白質で免疫して可溶性糖蛋白質の糖鎖部分に特異的に作用する糖鎖特異的抗体を製造することを特徴とする糖鎖特異的抗体の製造方法。

【効果】 可溶性糖蛋白質の糖鎖部分に特異的に作用する抗体を容易に製造することができる。また、本発明によって製造された抗体を用いることにより、癌等の疾患に特有の糖鎖構造を有する可溶性糖蛋白質を簡便に測定することができる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質に免疫寛容になった動物を、糖鎖の結合した可溶性糖蛋白質で免疫して可溶性糖蛋白質の糖鎖部分に特異的に作用する糖鎖特異的抗体を製造することを特徴とする糖鎖特異的抗体の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、可溶性糖蛋白質の糖鎖部分に特異的に作用する糖鎖特異的抗体の製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】アルファフェトプロテイン（AFP）や、癌胎児性抗原（CEA）、絨毛性ゴナドトロピン、ガンマグルタミントランスフェラーゼ蛋白質等の可溶性糖蛋白質では、細胞の癌化によって、糖鎖の構造が変化することが知られている。

【0003】例えば、アルファフェトプロテインは、肝臓癌等の肝臓疾患において、血中に放出されることが知られている可溶性糖蛋白質の一種であり、肝臓癌の診断において重要な測定項目となっている。近年、アルファフェトプロテインには、糖鎖構造が異なる分子種が存在することが報告され、糖鎖構造の差異に基づく分画定量が、黄疸等の良性疾病と肝細胞癌等との判別のため、有用であることが知られるようになった。この目的のため、これまでに、1）固相に抗アルファフェトプロテイン抗体を固定化してアルファフェトプロテインを捕捉し、このうち特定のレクチンと結合するアルファフェトプロテインのみを、酵素標識したレクチンで検出する方法、2）レクチンを含むアガロースゲル電気泳動で、アルファフェトプロテインを糖鎖に対する親和性の差に基づいて分離し、ニトロセルロース膜等に転写した後、抗アルファフェトプロテイン抗体を用いた免疫染色法により検出する方法〔キャンサー レター（Cancer Lett.）1986;31:325-331〕が開発されてきた。ところが、1）の方法はレクチンの糖鎖に対する親和性が低く、検出感度が実用上臨床検査の場に供せるものではなかった。また、2）の方法は、効率良く糖鎖の差異に基づいてアルファフェトプロテインを分離でき、臨床検査に十分使用に耐えうる性能を有しているものの、蛋白質を分離するのは煩雑で長時間を要し、さらに免疫染色後の発色強度を測定するための特別な装置が必要であるという問題があった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】そこで、このような問題を解決する方法として、癌等の疾患に特異的に出現する糖鎖を含んだ可溶性糖蛋白質を特異的に認識する抗体を用いた診断薬、治療薬の開発が望まれていた。

【0005】腫瘍に特異的な抗体を作製する方法としては、例えば、特開昭60-190721号公報に、動物

2

にヒト正常細胞又は正常組織もしくはそれらの膜成分を投与して免疫寛容（免疫的不応答状態）を誘導し、しかる後にヒト腫瘍細胞又は腫瘍組織もしくはそれらの膜成分で免疫し、腫瘍特異的なモノクローナル抗体を作製する方法が記載されている。しかし、この方法によれば、腫瘍組織や腫瘍細胞の膜表面に存在し、かつ正常細胞が腫瘍化する際に、発現量が増加するような抗原に対する抗体を作製することは可能であるが、細胞から分泌され、かつ腫瘍化によって構造が変化するような糖鎖を含有した可溶性糖蛋白質に特異的に作用する抗体を得ることは困難であった。

【0006】本発明は、癌等の疾患に特異的な糖鎖構造を有する可溶性糖蛋白質の糖鎖部分に特異的に作用する糖鎖特異的抗体の製造方法を提供することを目的とするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、このような課題を解決するために鋭意検討の結果、糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質に免疫寛容になった動物を、糖鎖の結合した可溶性糖蛋白質で免疫すると、可溶性糖蛋白質の糖鎖部分の特異的に認識する抗体が得られるということを見出し、本発明に到達した。

【0008】すなわち、本発明は糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質に免疫寛容になった動物を、糖鎖の結合した可溶性糖蛋白質で免疫して可溶性糖蛋白質の糖鎖部分に特異的に作用する糖鎖特異的抗体を製造することを特徴とする糖鎖特異的抗体の製造方法を要旨とするものである。

【0009】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に用いられる可溶性糖蛋白質としては、例えば、アルファフェトプロテイン、癌胎児性抗原（CEA）、絨毛性ゴナドトロピン、ガンマグルタミルトランスフェラーゼ蛋白質等が挙げられる。

【0010】本発明においては、まず、これらの可溶性糖蛋白質の糖鎖を除去した糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質で免疫寛容を行う。これらの糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質としては、例えば、ヒト血清中、あるいは、これらの可溶性糖蛋白質を産生する細胞から精製した可溶性糖蛋白質をグリコペプチダーゼF（宝酒造社製）等で処理して糖鎖部分を除去することによって得ることができる。また、これらの糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質は、遺伝子組換え技術を用いて大腸菌により産生させることも可能である。この場合、分子内のジスルフィド結合を維持し、天然物質に近い構造を持った糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質を得るには、COS細胞やCHO細胞、L細胞等のような真核細胞を用いることが望ましい。これらの細胞に、糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質を産生させるためには、ツニカマイシンのような糖鎖合成阻害剤の存在化で細胞を培養する方法や、糖鎖が結合するアミノ酸残基、例えば、アル

ファファクトプロテインのアスパラギン残基〔Asn232、プロシーディング オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンス ユーエスエー (Proc., Natl., Acad., Sci., USA. ), 80: 4604-4608, 1983〕を酵素的DNA増幅法 (Polymerase chain reaction: PCR) 等の手法により他のアミノ酸に置換し、上記の様な細胞で発現させる方法が挙げられる。

【0011】このようにして得られた糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質又は糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質を産生する細胞を、例えばマウス、ラット、ウサギ、ヤギ等の新生児、好ましくは生後24時間以内の新生児に注入することによって、動物に免疫寛容を誘導することができる。また、前記のように、アミノ酸置換を導入して糖鎖結合部位が変異を受けた可溶性糖蛋白質の遺伝子を、ネオマイシン耐性遺伝子等のマーカー遺伝子とともに従来の方法により動物の胚に導入し、トランスジェニック動物を作製することによっても免疫寛容を誘導することができる。さらに、糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質を経口投与することによっても免疫寛容を誘導することができる。このようにして、糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質に対して免疫寛容となった動物は、その後に糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質で免疫してもそれに対する抗体を産生する能力はない。

【0012】次に、このように糖鎖の結合していない可溶性糖蛋白質に対して免疫寛容になった動物を、糖鎖の結合した可溶性糖蛋白質で免疫すればよい。これらの可溶性糖蛋白質としては、例えば、絨毛膜癌患者や肝細胞癌患者の血清中あるいはこれらの可溶性糖蛋白質を産生する細胞の培養液から精製することができ、例えば、アルファファクトプロテインの場合には、タケタらの方法〔キャンサー レター (Cancer Lett.), 31:325-331, 1986〕により分画されるアルファファクトプロテインのL3画分を用いることが好ましい。

【0013】これらの糖鎖の結合した可溶性糖蛋白質の使用量、投与部位、アジュバントの使用等の免疫の方法は、従来の抗血清を得る方法に準ずればよい。例えば、マウスを用いる場合には、マウス1匹あたり、1回につき0.001~10mg、好ましくは0.01~1mgの糖鎖の結合した可溶性糖蛋白質を、初回はアジュバント (例えば、フロイントの完全アジュバント) とよく混合して、皮下又は腹腔内に投与する。さらに、2週間以上経過後、糖鎖の結合した可溶性糖蛋白質のみを静脈内、皮下又は腹腔内に投与すればよい。

【0014】このようにして最終免疫した後、1~4週間後に動物から血清を採取する。この血清を、例えば、プロテインAカラム、好ましくは免疫に用いた糖鎖の結合した可溶性糖蛋白質、例えばアルファファクトプロテインのL3画分、を固定化した単体 (例えば、セファロース等) を充填したカラムに吸着させ、溶出することにより、可溶性糖蛋白質の糖鎖部分に特異的に作用する抗体

を得ることができる。また、上記のようにして免疫寛容になった動物、好ましくはマウス又はラットを、糖鎖の結合した可溶性糖蛋白質で免疫し、抗体の産生を確認した後、この動物から脾臓細胞あるいは腸骨リンパ節細胞を調製し、公知の方法によりモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることも可能である。

【0015】このようにして得られた抗体は、可溶性糖蛋白質の糖鎖部分に特異的に作用するため、例えば、可溶性糖蛋白質として癌患者に特有の糖鎖構造を有するアルファファクトプロテインを用いた場合には、この抗体を用いて、黄疸のような良性的肝臓疾患患者で見られるアルファファクトプロテインと、肝臓癌等の癌患者に特異的に見られるアルファファクトプロテインとを選択的に検出することができる。

【0016】

【実施例】次に、本発明を実施例によって具体的に説明する。

【0017】参考例1 (糖鎖の結合していないアルファファクトプロテインの作成)

モリナガ等〔プロシーディング オブ ザ ナショナル アカデミー オブサイエンス ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 80, 4606-4608, 1983〕に記載のヒト由来アルファファクトプロテインの塩基配列に基づいて、5'及び3'領域のプライマーを合成して、Hepaticoma cDNAライブラリー (東洋紡社製、コードNo.CLHL1015b) からPCR法を用いてアルファファクトプロテインをコードする遺伝子断片を増幅し、アガロースゲル電気泳動で目的のサイズのDNA断片を分離精製した。得られたDNA断片をブランディングキット (宝酒造社製) を用いて末端を平滑化した後、両末端にEcoRI リンカー (宝酒造社製) をライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて結合させた。得られたアルファファクトプロテインのDNA断片をEcoRI (宝酒造社製) で一晚分解した後、アガロースゲル電気泳動により分離精製した。この断片をpCDM 8ベクター (フナコシ社製、IV-3082-01) のHindIII 部位にライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて結合させ、E. coli HB101 株 (宝酒造社製) を形質転換した。得られたコロニーからアルファファクトプロテイン遺伝子が正方向に挿入されているプラスミドを選択し、pCDM 8-AFPと命名した。

【0018】次に、pCDM 8-AFPにコードされるアルファファクトプロテインのアミノ酸残基Asp232に相当するコドンAATをAGTに代えたプラスミドを、PCR法を用いた突然変異導入法により作製し、pCDM 8-AFP(NS)と命名した。得られたpCDM 8-AFP(NS)をサル腎臓由来のCOS7細胞 (ATCC CRL 1651) にDEAEデキストラン法を用いて導入した。導入後の細胞をCO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養して、アルファファクトプロテインを培地中に産生させた。この培養上澄を電気泳動で解析したところ、培養した細胞からは糖鎖の結合していないアルファファクトプロ

テインが産生されていた。この培養上清を回収し、抗アルファフェトプロテイン抗体 NO. 5107〔メディックス バイオケミカ (Medix Biochemica) 社製〕を抗体/抗原固定化キット No. 44895 (ピアス社製) を用いて固定化した抗アルファフェトプロテイン抗体カラムを用いて精製を行ったところ、電気泳動的にほぼ単一の糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン (1) を得た。10 cm 径のシャーレ 50 枚分の培養上清から約 1250  $\mu$ g の糖鎖の結合していないアルファフェト

【0019】参考例2 (糖鎖の結合したアルファフェトプロテインの作成)

ヒト肝癌由来の HepG2 細胞 (ATCC HB 8065) を培養し  
〔培地: ミニマム エッセンシャル培地 (Minimum Essential medium) 41500-034, ライフテックオリエンタル社製〕、糖鎖が結合したアルファフェトプロテインを培養液中に蓄積させ、これを参考例1と同様にカラムクロマトグラフィーを利用して精製することにより、SDS 電気泳動的にほぼ均一の糖鎖の結合したアルファフェトプロテインを得た。10 cm 径のプレート 10 枚分の培養上清あたり約 1400  $\mu$ g 回収した。これをさらにタケタ

【0020】実施例1

参考例1で作製した糖鎖の結合していないアルファフェトプロテインを産生する COS7 細胞を、ウサギの新生児 3 匹 (生後 24 時間以内) の腹腔に  $1 \times 10^5$  細胞/匹となるよう投与した。1ヵ月後、このウサギの耳から血清を採取し、この血清の糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン (1) に対する抗体価を酵素免疫定量法 (ELISA) により測定した。すなわち、96穴マイクロタイタープレートに参考例1で作成した糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン (1) を物理的に吸着させ、これに、上記の方法で採取した血清をホスフェートバッファードサリン (PBS) で 50、500、5000 倍に希釈したものを、それぞれ 1 ウェルあたり 100 マイクロリットルずつ加え、2 時間室温 (25℃) で

【0021】次に、参考例1で作成した糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン (1) 50  $\mu$ g を等容

量のフロイントの完全アジュバント (ナカライテクス社製) と混合してエマルジョンを作製し、これを上記のウサギに皮下投与して免疫した。さらに 2 週間後に、参考例1で作成した糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン (1) 100  $\mu$ g を等容量のフロイントの完全アジュバント (ナカライテクス社製) とエマルジョン化し、これを追加投与した。さらに 3 週間後に参考例1で作成した糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン (1) 単独で最終免疫を行い、その 2 週間後に耳から採血して血清を分離採取した。この血清の糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン (1) に対する抗体価を上記と同様にして測定した。

【0022】その結果を表1に示す。なお、抗体価は、3匹のウサギの血清を用いて得られた ELISA における発色強度 (OD<sub>490</sub>) の平均値で表した。

【0023】

〔表1〕

血清の希釈率	抗体価
無添加	0.116
1/50	0.114
1/500	0.121
1/5000	0.118

【0024】表1に示すように、いずれのウサギの血清からも糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン (1) に対する抗体は検出されなかった。このことから、新生児のうちに糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン (1) を投与することで、糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン (1) に対する免疫寛容が誘導されたことがわかる。

【0025】次に、このようにして免疫寛容が誘導されたウサギの新生児 3 匹に、1ヵ月後、参考例2で作製した糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン (2) 50  $\mu$ g を等容量のフロイントの完全アジュバント (ナカライテクス社製) と混合してエマルジョンを作製し、これを皮下投与して免疫した。さらに 2 週間後に、参考例2で作製した糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン (2) 100  $\mu$ g を等容量のフロイントの不完全アジュバント (ナカライテクス社製) とエマルジョン化して追加投与した。さらに 3 週間後に、参考例2で作製した糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン (2) 単独で最終免疫を行い、その 2 週間後に採血して血清 49 ミリリットルを分離採取した。

【0026】次に、この血清の糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン (1) に対する抗体価を上記の方法で測定した。また、糖鎖の結合したアルファフェト

プロテイン(2)を固定化した96穴マイクロタイタープレートを作製し、同様にして糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン(2)に対する抗体価を測定した。さらに、糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン(2)をグリコペプチダーゼF(宝酒造社製)で処理して糖鎖部分を除去し、糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン(3)を作製し、これを96穴マイクロタイタ\*

\*ープレートに固定し、同様にして糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン(3)に対する抗体価を測定した。

【0027】その結果を表2に示す。

【0028】

【表2】

血清の希釈率	抗 体 価		
	対 (1)	対 (2)	対 (3)
1/50	0.120	1.240	0.126
1/500	0.114	1.160	0.124
1/5000	0.122	0.762	0.128

(1): 糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン(1)

(2): 糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン(2)

(3): (2)の糖鎖部分を除去した糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン(3)

【0029】表2に示すように、糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン(1)及び糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン(3)に対する抗体はいずれの血清からも検出されなかったのに対して、糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン(2)に対する抗体は、すべての血清から検出された。このことから、得られた抗体が、糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン(2)の糖鎖部分を認識していることがわかる。

#### 【0030】実施例2

参考例1で作製した糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン(1)を産生するCOS7細胞を、BALB/cマウスの新生児(生後24時間以内)の腹腔に $1 \times 10^5$ 細胞/匹となるように投与した。6週間後、参考例2で作製した糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン(2)を、等容量のフロイントの完全アジュバント(ナカライテクス社製)とエマルジョン化し、これを皮下投与した。さらに2週間後、参考例2で作製した糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン(2)をフロイントの不完全アジュバント(ナカライテクス社製)とエマルジョン化し、これを追加投与した。さらに2週間後、参考例2で作製した糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン(2)単独で最終免疫を行い、その3日後に尾から採血して血清を得た。この血清の糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン(1)、糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン(2)及び糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン(3)に対する抗体価を実施例1と同様にして測定したところ、糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン(2)に結合する抗体のみが検出され

た。

【0031】そこで、このマウスの脾臓を摘出し、その細胞をRPMI1640培地(ギコブ社製)に懸濁してあらかじめ培養しておいた骨髓腫細胞NS-1(ATCC TIB 18)と、マウス1匹から得られる脾細胞5に対して骨髓腫細胞1の割合で混合し、これを50重量%のポリエチレングリコール4000(シグマ社製)を用いて融合した。細胞融合後の細胞をHAT培地[GIT培地(日本製薬社製)にHAT-Midia Supplement(ベーリンガー・マンハイム社製)を添加したもの]に懸濁した後、96穴マイクロタイタープレートに分注して37℃で10日間培養した。培養上清の糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン(2)に対する抗体価を実施例1と同様にして測定して糖鎖の結合したアルファフェトプロテインに対して抗体産生陽性を示す穴を選び、限界希釈法を2回繰り返すことによりクローニングを行った。その結果、糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン(2)を認識する抗体を産生するハイブリドーマ株、MAH1~5が得られた。得られたハイブリドーマ株を10ミリリットルのGIT培地(日本製薬社製)で培養し、培養上清を粗モノクローナル抗体液とした。この粗モノクローナル抗体液の糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン(1)、糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン(2)及び糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン(3)に対する抗体価を実施例1と同様にして測定した。また、対照として、癌胎児性抗原(スクリプスラボラトリー社製、C0214)に対する抗体価を同様にして測定した。

【0032】その結果を表3に示す。

\*【表3】

【0033】

\*

モノクローナル抗体液		抗 体 価			
ハイマド株	抗体のクラス	対 (1)	対 (2)	対 (3)	対 CEA
MAH-1	IgG1	0.112	1.150	0.108	0.116
MAH-2	IgG1	0.117	1.028	0.124	0.113
MAH-3	IgG1	0.108	0.784	0.120	0.118
MAH-4	IgG1	0.114	0.896	0.118	0.110
MAH-5	IgG1	0.110	1.076	0.114	0.112

(1) : 糖鎖の結合していないアルファフェトプロテイン (1)

(2) : 糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン (2)

(3) : (2) の糖鎖部分を除去した糖鎖の結合していない

アルファフェトプロテイン (3)

CEA : 癌胎児性抗原

【0034】表3に示すように、得られたモノクローナル抗体はいずれも糖鎖の結合したアルファフェトプロテイン (2) に対して特異的に反応した。

【0035】参考例3

抗体/抗原固定化キットNo. 44895 (ピアス社製) を用いて、抗アルファフェトプロテイン抗体 No. 5107 (メディックス バイオケミカ (Medix Biochemica) 社製) を固定化した抗アルファフェトプロテイン抗体カラムを作製した。次に、494.2ng/ミリリットル [エルジア-AFPキット (ミドリ十字社製) を用いて測定] のアルファフェトプロテイン値を示す肝臓癌患者の血清500ミリリットルをPBSで5倍に希釈した後、PBSで平衡化した抗アルファフェトプロテイン抗体カラムに通液し、非吸着画分を回収して、これをサンプルAとした。また、同じ肝臓癌患者の血清500ミリリットルをPBSで5倍に希釈した後、抗アルファフェトプロテイン抗体を固定化していないカラム [抗体・抗原固定化キットNo. 44895 (ピアス社製) に添付] に通液し、非吸着画分を前記と同様にして回収し、これをサンプルBとした。サンプルBのアルファフェトプロテイン値は83.1ng/ミリリットルであった。さらに、92.3ng/ミリリットルのアルファフェトプロテイン値を示す慢性肝炎患者の血清サンプルをサンプルCとした。

【0036】次に、実施例1で分離採取した血清から、プロテインAカラムにより抗体を精製した。すなわち、採取した血清10ミリリットルを50mMの炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.6) で50倍に希釈した後、同緩衝液で平衡化したプロテインAセファロースカラム (ピアス社製) に通液した。通液後、50mMのトリス塩酸緩衝液 (pH8.6) で洗浄し、グリシン塩酸緩衝液

(pH2.3) で溶出を行った。抗体を含む画分を集めてPBSに透析したところ、抗アルファフェトプロテイン抗体を含む抗体溶液 (総蛋白量1.2mg) が得られた。得られた抗体溶液を50mMの炭酸ナトリウム緩衝液 (pH9.6) で希釈して96穴マイクロタイタープレートに100マイクロリットルずつ分注し、4℃で一晩放置した。この液を除去した後、各穴にさらに1% (w/v) の牛血清アルブミン (BSA)、0.15Mの塩化ナトリウムを含むPBSを充満させ、室温 (25℃) で2時間放置した。さらにこの液を除去し、0.2% (w/v) のトウイーン20 (Tween20)、0.2% (w/v) のBSA、0.15Mの塩化ナトリウムを含む20mMのリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2) からなる洗浄液で各穴を洗浄し、抗アルファフェトプロテイン固相化抗体プレートを作製した。

【0037】このようにして得られた抗アルファフェトプロテイン固定化抗体プレートに、サンプルA、B及びCを順次希釈して50マイクロリットルずつ加え、90分間室温 (25℃) に放置した。このプレートを先に示した洗浄液で3回洗浄した後、抗アルファフェトプロテインモノクローナル抗体No. 5108 (メディックス社製) をPBSで3000倍に希釈したものを加えて30分間室温 (25℃) で放置した。その後、PBSで3回洗浄し、さらに西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼで標識したヤギ抗ウサギIgG抗体 (バイオラッド社製) を300倍に希釈したものを各穴に50マイクロリットルずつ加え、室温 (25℃) で1時間放置した。その後、洗浄液で5回洗浄し、発色基質液を100マイクロリットル加えて室温 (25℃) で30分間放置した。10% (w/v) のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 50マイクロリットルを加えて反応を停止し、415nmの吸光度

を測定した。その結果を図1に示す。

【0038】図1は、本発明によって製造された抗体を用いてアルファフェトプロテインを検出したときの結果を示す図であり、縦軸に吸光度（A460）を、横軸に希釈倍率を示しており、この図1に示すように、実施例1で作製した抗体は、抗アルファフェトプロテイン抗体で処理した肝臓癌患者の血清（サンプルA）には反応しないのに対して、抗アルファフェトプロテイン抗体で処理していない肝臓癌患者の血清（サンプルB）とは反応していることから、この抗体はアルファフェトプロテインに対して特異的であることがわかる。さらに、肝臓癌患者の血清（サンプルB）に対する特異性は、慢性肝炎患者の血清（サンプルC）に対する特異性に比べて非常に高いことがわかる。このことから、本発明によって得\*

\*られた抗体を用いた測定用試薬を使用すれば、肝臓癌に伴う糖鎖構造を有するアルファフェトプロテインを特異的に検出することができる。

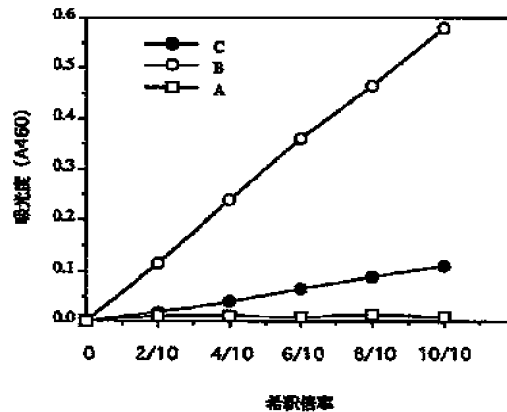
【0039】

【発明の効果】本発明によれば、可溶性糖蛋白質の糖鎖部分に特異的に作用する糖鎖特異的抗体を容易に製造することができる。また、本発明によって製造された糖鎖特異的抗体を用いることにより、癌等の疾患に特有の糖鎖構造を有する可溶性糖蛋白質を簡便に測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明によって製造された抗体を用いてアルファフェトプロテインを検出したときの結果を示す図である。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>5</sup>  
 // A61K 39/395  
 C12N 15/02  
 (C12P 21/08  
 C12R 1:91)

識別記号 片内整理番号  
 B

F I

技術表示箇所